

# Optimising outcomes after liver transplantation

Citation for published version (APA):

Reiling, J. (2017). *Optimising outcomes after liver transplantation: Pathophysiology of biliary injury and the application of machine perfusion*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Proefschriftmaken.nl || Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20170426jr>

**Document status and date:**

Published: 01/01/2017

**DOI:**

[10.26481/dis.20170426jr](https://doi.org/10.26481/dis.20170426jr)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary



## Summary

**Chapter 1** provides a general introduction to liver transplantation and the current clinical limitations as well as overview of the outline of this thesis. Currently more livers donated after circulatory death (DCD) are being considered for transplantation in order to increase the number of donor livers available for patients on the transplant waiting list. Unfortunately, the use of these grafts is often complicated by the formation of ischaemic type biliary strictures (ITBS). As a result, DCD liver recipients frequently undergo re-interventions and long-term graft survival is limited. The overarching aim of this thesis was to better understand the pathophysiology of biliary stricture formation in DCD donors. To achieve this we developed an animal model of biliary injury as well as an *ex-vivo* normothermic machine perfusion setup used to perfuse livers declined for transplantation.

In **Chapter 2** the characteristics of all adult organ donors over the last decade were reviewed to determine the impact of DCD donation on liver transplantation rates in Australia. Since the implementation of DCD donation in 2008, their contribution to the overall number of organ donors steadily increased to 29% in 2014. Unfortunately DCD grafts were used only in a small proportion of cases, which contributed to an increase in the number of livers declined for transplantation (42 (26%) in 2005 versus 141 (43%) in 2014). Furthermore, multivariable regression identified DCD donor type as the most important independent risk factor for liver non-use (OR 24.06 (95%CI 17.47-33.14)) followed by advanced donor age, obesity, and diabetes. The limited use of DCD donors is likely the result of the unacceptably high risk of ITBS formation. A better understanding of the pathophysiology of these strictures is required to ultimately facilitate the use of more DCD grafts. Another possible approach could be the use of machine perfusion as an alternative preservation method. Additionally, modifiable risk factors such as the period of warm and cold ischaemic time should be kept to a minimum. Characterisation of DCD grafts declined for transplantation in the state of Queensland identified 33 (41%) donors who had zero, one or two marginal donor criteria that could be likely candidates for the application of machine perfusion.

**Chapter 3** focussed on pathophysiology of biliary injury. In this study, the role of lipopolysaccharides (LPS) and ischaemia-reperfusion was assessed. Rats were exposed to 1mg/kg of LPS or 30 minutes of warm hepatic ischaemia to 70% the liver. The animals were subsequently allowed to recover for one or six hours after which bile, blood, liver and common hepatic bile duct tissue was collected. No evidence of biliary injury was observed following 30 minutes of warm ischaemia and six hours of reperfusion. However, severe small bile duct injury was present six hours after the administration of LPS, which was associated with impaired clearance of bile acids from

---

the circulation. In this experiment we furthermore assessed the permeability of the blood-biliary-barrier (BBB) using horseradish peroxidase (HRP). Following intravenous injection, more HRP leaked across the BBB and appeared into bile in the LPS groups. These findings were associated with a significant decrease in *Claudin-1* and *claudin-3* gene expression, both genes encoding for important tight junction proteins. Furthermore, immunofluorescence staining for Zonula occludens-1, showed markedly deranged tight junction morphology with a staining pattern not confined to the junctions of neighbouring cholangiocytes. The findings of this study highlighted the potency of endotoxins such as LPS to induce biliary injury.

In **chapter 4** we aimed to determine the role of Kupffer cells in the development of LPS-mediated biliary injury. Kupffer cells become activated upon stimulation with LPS and we therefore hypothesised that in their absence, LPS mediated biliary injury would not occur. Rats were pre-treated with clodronate liposomes and exposed to sham operation, 1mg/kg LPS administration or LPS administration combined with 30 minutes of warm hepatic ischaemia to 70% of the liver. Despite successful depletion of macrophages from the liver, no reduction in biliary injury was observed following six hours of reperfusion. In addition, increased BBB permeability persisted. As cholangiocytes themselves can play a role in innate immunity and respond to LPS in a toll-like receptor-4 dependant fashion, biliary concentrations of several cytokines and chemokines were assessed to gain insight into the local inflammatory milieu surrounding cholangiocytes. Monocyte chemoattractant protein-1 (Mcp-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (Timp-1) were 8.3 and 10.3-fold increased following LPS administration or LPS combined with warm hepatic ischaemia. Macrophage depletion did not affect the levels of Timp-1 and Mcp-1. Results from this study show that macrophages do not play a pivotal role in the development of LPS-induced biliary injury. Instead, cholangiocytes themselves might be responsible for the induction of small bile duct injury however further studies are required to confirm this.

Results from the animal experiment prompted the study conducted in human organ donors as described in **chapter 5**. The concentration of endotoxins and other inflammatory mediators was assessed in portal blood from organ donors. We hypothesised that the concentration of inflammatory mediators was increased in portal blood collected from DCD donors due to a period of hypo-perfusion and hypoxia prior to organ retrieval. Based on the convincing results of the rat study we further hypothesised that these pro-inflammatory mediators such as endotoxins were responsible for the induction of biliary injury in DCD donors. In total, nine DCD donors and 21 brain death donors (DBD) were included in this study. No differences were found in the presence of pro-inflammatory mediators in portal blood between DCD and DBD donors, both by the direct measurement of endotoxin and by the use of a bioassay for inflammatory stimuli. Despite the absence of pro-inflammatory

mediators, Kupffer cell activation was enhanced and prolonged in DCD donors. In addition, biliary injury could already be detected in DCD donors at the time of organ retrieval.

The second section of this thesis was aimed at the development of an *ex vivo* normothermic machine perfusion (NMP) protocol at our hospital. This system served as a platform to further study bile ducts of DCD donors and was also used as an assessment tool to determine graft viability of livers previously deemed unsuitable for transplantation. In **Chapter 6** the different machine perfusion setups used in preclinical and clinical settings around the globe were reviewed. The aim of this systematic review was to determine the safety and applicability of machine perfusion. In total, 22 manuscripts were identified and all but one were published within the last five years. The corresponding author of each manuscript was approached to provide information regarding the safety of their perfusion protocol and none had encountered major technical complications that resulted in the loss of a liver graft. Both hypothermic perfusion as well as normothermic perfusion has been used prior to transplantation in a small case series and the results are promising. Equal or superior graft function is observed and hypothermic machine perfusion convincingly reduced the incidence of ITBS following transplantation of DCD grafts. However as NMP is the only modality that allows for graft assessment prior to transplantation, we proceeded to establish this technique at our centre.

An NMP protocol was developed at the Princess Alexandra Hospital and the first results were described in **Chapter 7**. Perfusate was pumped from the inferior vena cava using a centrifugal pump and flushed through an oxygenator with an inbuilt heat exchanger. Oxygen rich perfusate was then supplied directly to the hepatic artery whereas the portal vein was gravity fed via a reservoir. During the perfusion, amino acids, insulin and bile acids were continuously infused and a scavenger system was in place to recirculate leaked perfusate back into the closed system. To date, ten livers, all declined for transplantation, have been perfused using our custom-made perfusion circuit as described in **chapter 8**. Based on the currently available literature, lactate clearance within two hours of perfusion was used to distinguish viable from non-viable livers. Ultimately, seven livers were deemed viable whereas three livers were deemed non-viable. Compared to non-viable livers, viable grafts had significantly lower concentrations of potassium, AST and  $\gamma$ -glutamyl transferase and increased urea concentrations in their perfusate. Furthermore at end of perfusion, liver morphology was preserved upon histological assessment.

As NMP was shown to have a protective effect on bile ducts in animal studies, we assessed the degree of injury to the common bile duct (CBD) at the time of organ donation, prior to the start of machine perfusion and at the end of perfusion in a

---

semi-quantitative fashion. Unfortunately, severe biliary injury was observed in CBD sections collected at the end of perfusion, regardless of metabolic function. The degree of injury to the CBD however was not found to correlate with the degree of injury to the main hepatic ducts or the segmental ducts. These findings underline the need for a biomarker of biliary injury or viability in order to determine which grafts are unsuitable for transplantation due to a high risk of ITBS formation. This will be the focus of future studies.

**Chapter 9** described the key findings of this thesis and discussed the results and implications for clinical practice. Furthermore, avenues for future research were described.

## Samenvatting





## Samenvatting

In **Hoofdstuk 1** wordt in het een kort overzicht gegeven van de geschiedenis van de levertransplantatiechirurgie. Daarnaast worden de huidige klinische limitaties besproken en wordt het doel van dit proefschrift gepresenteerd.

Momenteel zijn er niet genoeg donorlevers beschikbaar voor alle patiënten op de wachtlijst waardoor er wordt overwogen om meer levers afkomstig van non-heartbeating donoren te gebruiken voor transplantatie. Echter is het gebruik van deze levers geassocieerd met de ontwikkeling van galwegstricturen. Dit heeft tot gevolg dat patiënten die een dergelijke lever ontvangen frequenter re-interventies ondergaan en uiteindelijk is re-transplantatie in eenderde van de gevallen noodzakelijk. De voornaamste doelstelling van dit proefschrift was om de pathofysiologie van galwegstricturen na transplantatie van een non-heartbeating donorlever in kaart te brengen. Om dit doel te bereiken werd er gebruik gemaakt van zowel een diermodel voor galweschade als een ex-vivo normotherm machineperfusiesysteem voor humane levers.

In **hoofdstuk 2** worden de resultaten van een review van alle Australische orgaandonoren tussen 2005 en 2014 gepresenteerd. Sinds de implementatie in 2008 is het aantal non-heart-beating orgaandonoren gestaag toegenomen. Echter werden levers afkomstig van deze donoren maar zelden gebruikt voor transplantatie, wat ertoe leidde dat de proportie niet geaccepteerde levers toenam van 42 (26%) in 2005 naar 141 (43%) in 2014. Een multivariabele regressieanalyse liet tevens zien dat non-heart-beating donatie de grootste onafhankelijke risicofactor was om een lever niet te accepteren voor transplantatie, gevolgd door hoge leeftijd, obesitas en diabetes. Naast het verkrijgen van een beter inzicht in de ontwikkeling van galwegstricturen kan ook het gebruik van machineperfusie worden overwogen om meer levers afkomstig van non-heart-beating donoren te gebruiken voor transplantatie. In de Australische staat Queensland werden 33 (41%) non-heart-beating orgaandonoren geïdentificeerd die geschikte kandidaten zouden kunnen zijn voor machine perfusie.

In **hoofdstuk 3** wordt de pathofysiologie van galweschade verder bestudeerd. In de studie beschreven in dit hoofdstuk, werd gekeken naar de rol van lipopolysachariden (LPS) en ischemische-reperfusie op het ontstaan van galweschade. Ratten werden blootgesteld aan 1mg/kg LPS, warme ischemie van de lever voor 30 minuten of een combinatie van beiden. Eén of zes uur na de ingreep werden vervolgens bloed, gal, lever en galwegweefsel verzameld. Leverischemie gedurende 30 minuten en reperfusie gedurende zes uur bleek geen nadelig effect te hebben op de galwegen. Echter er ontwikkelde zich wel ernstige galweschade zes uur na blootstelling aan LPS of ischemie gecombineerd met LPS, welke gepaard ging met verminderde hepatische

---

klaring van galzouten uit de systemische circulatie. In dit experiment werd horseradish peroxidase (HRP) gebruikt om de permeabiliteit van de bloed-gal-barrière te testen. Deze barrière bestaat uit naburige cholangiocyten die met elkaar verbonden zijn middels tight-junctions. Na intraveneuze injectie werd meer HRP in gal gevonden in de groepen ratten die behandeld waren met LPS, dit duidt op verminderde functie van de bloed-gal-barrière. Deze bevindingen waren geassocieerd met een verlaagde genexpressie van *claudin-1* en *claudin-3*, die beiden coderen voor tight-junction-eiwitten. Tevens liet een immunofluorescente kleuring een sterk verstoord kleuringspatroon zien van het tight-junctioneiwit zonula-occludens-1. Resultaten van deze rattenstudie tonen aan dat endotoxines zoals LPS zeer potent zijn in het veroorzaken van galwegschade.

In **hoofdstuk 4** wordt de rol van Kupffercellen in de ontwikkeling van LPS gemedieerde galwegschade bestudeerd. Bloodstelling aan LPS kan leiden tot activatie van Kupffercellen. De hypothese was dat LPS-gemedieerde galwegschade niet zou optreden in afwezigheid van Kupffercellen. Ratten werden voorbehandeld met clodronaatbevattende liposomen waarna ze werden blootgesteld aan LPS of een combinatie van LPS en warme ischemie van de lever. Ondanks het feit dat Kupffercellen succesvol werden verwijderd uit de lever, ontstond nog steeds ernstige galwegschade. Tevens bleef de functie van de bloed-gal-barrière verminderd. Om een beter inzicht te krijgen in het inflammatoire milieu rondom cholangiocyten, werd de concentratie van verschillende cytokines in gal gemeten. De hoeveelheid monocyte-chemoattractant protein-1 (Mcp-1) en tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (Timp-1) waren 8.3x en 10.3x verhoogd na blootstelling aan LPS en LPS gecombineerd met warme ischemie. Kupfferceldepletie had geen effect op de concentratie Timp-1 en Mcp-1. Op basis van deze studie kan worden geconcludeerd dat Kupffercellen geen prominente rol spelen in de ontwikkeling van LPS-gemedieerde galwegschade. Echter lijken cholangiocyten zelf mogelijk een rol te spelen.

De bevindingen in de rattenstudies leidden tot de initiatie van een studie met humane orgaandonoren welke wordt beschreven in **hoofdstuk 5**. De concentratie van endotoxines en andere pro-inflammatoire factoren werden bepaald in portaal bloed van orgaandonoren. De hypothese was dat portoveneus bloed van non-heart-beating donoren een hogere concentratie pro-inflammatoire factoren zou bevatten als gevolg van hypoxie en hypoperfusie van de darm, gedurende orgaandonatie. Tevens werd verondersteld dat pro-inflammatoire factoren zoals endotoxines verantwoordelijk waren voor de inductie van galwegschade in non-heart-beating donorleveren. In totaal werden negen non-heart-beating en 21 heart-beating orgaandonoren geïncludeerd in de studie. Er werd geen verschil gevonden in de hoeveelheid pro-inflammatoire factoren tussen deze twee typen orgaandonoren. Desondanks, werd er een verhoogde activatie van macrofagen in de lever vastgesteld; en galwegbiopten van

non-heart-beating donoren vertoonden meer galwegschade in vergelijking met die van heart-beating donoren.

Het tweede gedeelte van dit proefschrift is met name gericht op het gebruik van normotherme machine perfusie (NMP) van humane marginale levers. Dit systeem werd niet alleen gebruikt om te differentiëren tussen levers die geschikt zijn voor transplantatie en levers die uiteindelijk onvoldoende functioneren, maar ook om de galwegen van non-heart-beating donoren verder te bestuderen. Allereerst werd systematisch de beschikbare literatuur bestudeerd in **hoofdstuk 6** met als doel de veiligheid en bruikbaarheid van machine perfusie protocollen in pre-klinisch en klinisch onderzoek in kaart te brengen. In totaal werden 22 publicaties geïdentificeerd die hypotherme, midtherme of normotherme machineperfusie-protocollen beschreven welke elke werden gezien als veilig en bruikbaar. Een klein aantal hypotherm en normotherm geperfuseerde marginale levers zijn inmiddels gebruikt voor transplantatie met goede resultaten. Tevens ontwikkelen patiënten die hypotherm geperfuseerde non-heart-beating donorlevers ontvingen significant minder galwegstricturen in vergelijking met patiënten die een niet geperfuseerde non-heartbeating donorlever ontvingen. Echter aangezien NMP als enige methode de mogelijkheid biedt om leverfunctie te testen alvorens de lever wordt getransplanteerd, werd besloten om een protocol op te zetten in ons centrum in Brisbane (Australië).

Er werd een NMP protocol ontwikkeld in het Princess Alexandra Ziekenhuis, in Brisbane (Australië) en de eerste resultaten worden besproken in **hoofdstuk 7**. Het perfusiesysteem werkt als volgt: perfusievloeistof (bloed van de orgaandonor) werd uit de vena cava inferior gepompt met behulp van een centrifugaal pomp, waarna de perfusievloeistof door een oxygenator stroomde welke tevens de perfusievloeistof opwarmde tot 37 graden Celcius. Zuurstofrijk bloed werd vervolgens direct naar de a. hepatica geleid terwijl de vena porta werd gevoed door middel van een reservoir. Tijdens de perfusie werden constant aminozuren, insuline en galzouten toegediend en werd er elke vier uur een bolus heparine gegeven om embolieën te voorkomen. Over de afgelopen twee en een half jaar werden tien levers, voorheen bestempeld als ongeschikt voor transplantatie, middels dit systeem geperfuseerd (**hoofdstuk 8**). Lactaatklaring gedurende de eerste twee uur op de perfusiemachine werd gebruikt om te differentiëren tussen levers die geschikt zijn voor transplantatie en levers die uiteindelijk onvoldoende functioneren. Op basis van dit criterium zouden zeven normotherm geperfuseerde levers mogelijk bruikbaar zijn geweest voor transplantatie. Vergeleken met levers die onbruikbaar werden geacht hadden bruikbare levers een lagere concentratie kalium, AST en  $\gamma$ -glytamyl transferase en een hogere concentratie ureum in de perfusievloeistof. Aan het einde van de

---

perfusieperiode van gemiddeld zes uur werden geen histologische tekenen van leverschade gevonden.

Eerdere dierstudies hebben aangetoond dat NMP schade aan de galwegen kan verminderen. Om de invloed van NMP op humane galwegen te beoordelen werden er biopsies genomen van de ductus choledochus tijdens orgaandonatie en aan het begin en eind van NMP. Helaas was schade aan de ductus choledochus onvermijdelijk, ongeacht de metabole functie van de lever. Echter, de hoeveelheid schade aan de ductus bleek niet te correleren aan de hoeveelheid schade aan de grote intrahepatische galwegen en de segmentale galwegen. Toekomstige studies dienen zich daarom te focussen op het ontwikkelen van een biomarker voor galwegschaade, om zo veilig non-heartbeating donorlevers te kunnen gebruiken voor transplantatie.

**In hoofdstuk 9** worden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift beschreven en worden de implicaties voor de kliniek bediscussieerd. Tevens wordt de focus van toekomstige studies besproken.